

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/755, A61K 38/37</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/31138 (43) Date de publication internationale: 24 juin 1999 (24.06.99)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02715 (22) Date de dépôt international: 14 décembre 1998 (14.12.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/15888 15 décembre 1997 (15.12.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LABO- RATOIRE FRANÇAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES [FR/FR]; Zone d'Activité de Courtaboeuf, 3, avenue des Tropiques, F-91940 Les Ulis (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHTOUROU, Abdessatar (Sami) [FR/FR]; 20, avenue du Château, F-78990 Elancourt (FR). NOGRE, Michel [FR/FR]; 22, rue Georges Clémenceau, F-92170 Vanves (FR). PORTE, Pierre [FR/FR]; 21, rue des Genêts, F-91250 Saint-Germain-les-Corbeil (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regim- beau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>

(54) Title: METHOD FOR PREPARING BY FILTRATION A VIRALLY SECURE FACTOR VIII SOLUTION

(54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION PAR FILTRATION D'UNE SOLUTION DE FACTEUR VIII SECURISEE VIRALEMENT

(57) Abstract

The invention concerns a method for preparing by filtration a virally secure factor VIII solution and essentially free of high molecular weight vWF which consists in: preparing a solution containing high or very high purity factor VIII or essentially free of complexes with VIII-vWF factor high molecular weight; optionally carrying out a step (a) if required, of chemical breakdown of the complexes with VIII-vWF factor high molecular weight and obtaining a solution essentially free of factor VIII associated with high molecular weight vWF; carrying out a step (b) filtering said solution essentially free of factor VIII associated with high molecular weight vWF on a hydrophilic filter with porosity as low as 15 nm.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un procédé de préparation par filtration d'une solution de facteur VIII sécurisée viralement et essentiellement dépourvue de vWF de haut poids moléculaire, selon lequel: on prépare une solution contenant du facteur VIII de haute ou très haute pureté contenant ou essentiellement dépourvue de complexes de haut poids moléculaire facteur VIII-vWF; on met en oeuvre de façon optionnelle, une étape a) permettant, si nécessaire, la dissociation des complexes de haut poids moléculaire facteur VIII-vWF et l'obtention d'une solution essentiellement dépourvue de facteur VIII associé à du vWF de haut poids moléculaire; on met en oeuvre une étape b) de filtration de ladite solution essentiellement dépourvue de facteur VIII associé à du vWF de haut poids moléculaire sur un filtre hydrophile ayant une porosité aussi faible que 15 nm.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

PROCEDE DE PREPARATION PAR FILTRATION
D'UNE SOLUTION DE FACTEUR VIII SECURISEE VIRALEMENT

La présente invention concerne un procédé de préparation
5 par filtration d'une solution de facteur VIII sécurisée
viralement et essentiellement dépourvue de facteur von
Willebrand (vWF) de haut poids moléculaire, à partir d'une
solution de facteur VIII de haute ou très haute pureté et
contenant ou essentiellement dépourvue de complexes de haut
10 poids moléculaire facteur VIII-vWF.

Le facteur VIII est un composant protéique du sang utilisé
depuis de nombreuses années pour le traitement d'individus
souffrant d'hémophilie A, une maladie congénitale causée par une
déficience ou une absence de facteur VIII dans le sang. On a
15 utilisé pendant longtemps des concentrés plasmatiques enrichis
en facteur VIII pour le traitement des patients.

Les concentrés les plus couramment utilisés étaient le
cryoprécipité et les concentrés purifiés obtenus à partir du
cryoprécipité. On appelle usuellement cryoprécipité, un
20 précipité obtenu à partir d'un plasma humain congelé par une
technique de fractionnement plasmatique à basse température. Le
plasma congelé est ramolli à une température d'environ -5°C à
-15°C puis réchauffé lentement sous agitation à une température
qui ne dépasse pas 3°C. Dans ces conditions, le plasma gelé fond
25 partiellement pour donner une phase liquide et une phase solide,
la phase solide étant alors récupérée par centrifugation pour
donner le cryoprécipité, qu'il convient alors de purifier pour
obtenir des préparations de facteur VIII suffisamment pures.
Cette fraction cryoprécipitée est composée essentiellement de
30 fibronogène, fibronectine, facteur VIII et facteur Von
Willebrand (vWF).

Dans cette fraction cryoprécipitée, le facteur VIII est
généralement associé au vWF qui stabilise le facteur VIII par
complexation.

Pendant longtemps, les étapes de purification visèrent essentiellement à séparer du facteur VIII, des protéines indésirables telles que notamment le fibrinogène et la fibronectine.

5 Toutefois, on sait maintenant qu'un des problèmes essentiels liés à la préparation du facteur VIII à partir du plasma, réside dans la nécessité d'inactiver/d'éliminer des virus originellement contenus dans le sang avec des rendements satisfaisants.

10 Bien qu'il soit difficile d'établir une liste exhaustive de ces virus, on peut citer en particulier les différents virus hépatiques, hépatite A, hépatite B, hépatite C, hépatite G ou encore, les différentes formes du virus du Sida (VIH).

15 De nombreuses techniques d'inactivation virale ont ainsi été développées telles que le chauffage à sec, la pasteurisation, le traitement solvant-détergent. L'ensemble de ces techniques est relativement efficace vis à vis des virus enveloppés mais l'inactivation ou l'élimination des virus nus, notamment des petits virus tels que le parvovirus B19 ou le
20 virus de l'hépatite A, reste l'un des problèmes majeurs.

25 Des technologies plus récentes utilisent les capacités de rétention virale de membranes de faible taille de pores. Ces technologies présentent effectivement une efficacité notable vis à vis de virus de petite taille tels que les parvovirus B19 ou le virus de l'hépatite A et peuvent être appliquées à des
30 protéines de faible poids moléculaire. Cependant, les seuils de coupure utilisés, qui sont inférieurs à 900 kD, ne permettent pas d'envisager la filtration de protéines ou complexes protéiques de haut poids moléculaire comme le facteur VIII sans perte majeure de rendement.

Ainsi par exemple, la publication de brevet WO96/00237 décrit une méthode pour améliorer la filtrabilité des protéines dans une solution contenant au moins une macromolécule, qui consiste à utiliser une solution dans laquelle la teneur totale

en sel varie de 0.2 M à saturation de la solution avec le sel concerné. Cette forte teneur en sel a pour effet d'augmenter les rendements de filtration. De préférence, l'étape de filtration est mise en oeuvre à un stade où l'activité spécifique de la macromolécule d'intérêt est déjà très élevée, de sorte qu'il est possible d'utiliser un filtre à structure très fine et d'éliminer des virus très petits.

Cependant, ce document n'envisage absolument pas la filtration de solutions contenant des molécules de très haut poids moléculaire telles que le facteur VIII, et notamment le facteur VIII d'origine plasmatique, lequel est généralement associé à du vWF, formant ainsi des complexes de haut poids moléculaire. Ce document cite l'exemple d'une forme délétée du facteur VIII recombinant avec un poids moléculaire moyen de l'ordre de 170 kD et totalement dépourvu en vWF. Tous les exemples portent sur le facteur IX dont le poids moléculaire moyen est de l'ordre de 55 kD, et ce document souligne que la méthode décrite est particulièrement adaptée à cette taille de molécule, le seuil de coupure du filtre devant par ailleurs être légèrement plus élevé que la taille de la molécule à filtrer. Ainsi, pour le facteur IX, le filtre utilisé a un seuil de coupure de 70 kD.

Or, comme indiqué précédemment, le facteur VIII, selon son origine, peut se présenter sous une forme complexée qui lui donne une taille significative, laquelle peut atteindre 20 000 kD en termes de poids moléculaire et plusieurs dizaines de nanomètres en terme de taille particulière (> 106 nm pour l'axe principal de la molécule, Eppel et al., Langmuir 1993, 9, 2281-88, American Chemical Society). Aucun moyen n'est disponible actuellement pour filtrer de façon satisfaisante, ce type de molécules et simultanément éliminer des virus de petite taille tels que par exemple les Parvovirus B19 qui ont une taille de l'ordre de 18 à 20 nm.

Les inventeurs ont maintenant trouvé de façon surprenante qu'il était possible d'obtenir par filtration une solution de facteur VIII sécurisée viralement et essentiellement dépourvue de vWF de haut poids moléculaire, à partir d'une solution
5 contenant du facteur VIII de haute ou très haute pureté contenant ou essentiellement dépourvue de complexes de haut poids moléculaire facteur VIII-vWF.

C'est pourquoi l'invention a pour objet un procédé de préparation par filtration d'une solution de facteur VIII
10 sécurisée viralement et essentiellement dépourvue de vWF de haut poids moléculaire, selon lequel :

- on prépare une solution contenant du facteur VIII de haute ou très haute pureté contenant ou essentiellement dépourvue de complexes de haut poids moléculaire facteur VIII-
15 vWF ;

- on met en oeuvre de façon optionnelle, une étape a) permettant, si nécessaire, la dissociation des complexes de haut poids moléculaire facteur VIII-vWF et l'obtention d'une solution essentiellement dépourvue de facteur VIII associé à du vWF de
20 haut poids moléculaire ;

- on met en oeuvre une étape b) de filtration de ladite solution essentiellement dépourvue de facteur VIII associé à du vWF de haut poids moléculaire sur un filtre hydrophile ayant une porosité aussi faible que 15nm.

25 La préparation par filtration d'une solution de FVIII permet avantageusement d'obtenir une solution essentiellement dépourvue de vWF de haut poids moléculaire, notamment de vWF ayant un degré de polymérisation supérieur ou égal à 15, c'est-à-dire dans laquelle le vWF est contrôlé à la fois
30 qualitativement et quantitativement. Le procédé selon l'invention permet également d'augmenter significativement les rendements de filtration grâce à la diminution de la quantité de complexes protéiques de haut poids moléculaire, et d'obtenir une solution ayant un degré de pureté satisfaisant tout en assurant

l'élimination virale des virus pathogènes humains de taille $\geq 15\text{nm}$.

L'étape a) permettant la dissociation d'un complexe de haut poids moléculaire facteur VIII-vWF, est nécessaire ou pas selon l'origine et le mode de préparation de la solution de facteur VIII de départ, qui conditionnent la présence ou non de facteur VIII associé à du vWF de haut poids moléculaire dans la solution de départ.

La dissociation du complexe FVIII-vWF est obtenue au moyen d'au moins un ion chaotropique présent en quantité suffisante pour permettre la dissociation. Tous les ions connus pour avoir une activité chaotropique sont utilisables.

Il s'agira de préférence d'ions divalents apportés à la solution de facteur VIII sous forme d'une solution saline de 0,2M à saturation des sels.

On peut citer à titre d'exemple non limitatif, CaCl_2 , ou encore MgCl_2 . On utilisera de préférence une solution de CaCl_2 . La concentration de la solution sera de préférence environ 0.35M.

On a constaté que, outre les conditions propres à la filtration, les conditions utilisées pour la dissociation ont une influence sur le rendement de la filtration ultérieure. Les paramètres qui définissent l'ensemble de ces conditions sont, lors de l'étape de dissociation, la nature des sels et leur concentration, et lors de l'étape de filtration, la pression et la température.

De façon surprenante, les rendements de filtration sont considérablement améliorés lorsque la pression transmembranaire lors de la filtration est abaissée à des valeurs très faibles, en deçà des seuils de recommandations préconisés par le fournisseur de filtres.

La température exerce aussi une influence non négligeable sur les rendements de filtration, des valeurs trop fortes ou trop faibles de la température ayant pour effet d'augmenter le

nombre des formes multimères du vWF. Avantageusement, on choisira une température de l'ordre de $35 \pm 5^\circ\text{C}$.

Parmi les filtres à virus disponibles sur le marché ou en cours de développement, on peut citer par exemple la membrane
5 Planova® 15N commercialisée par la Société Asahi Chemical Industry. Dans ce cas, le filtre est utilisé de préférence à une pression inférieure à 0,3 bar, avantageusement inférieure à 0,2 bar.

Différentes techniques de filtration peuvent être mises en
10 oeuvre. Les techniques les plus courantes sont les techniques de filtration tangentielle ou de filtration frontale qui peuvent être mises en oeuvre avec les mêmes types de filtres.

La solution de facteur VIII de départ, préalablement purifiée, peut être préparée de différentes façons, par exemple,
15 à partir d'une fraction plasmatique telle que la fraction cryoprécipitée du plasma, ou encore par voie recombinante. Toutes les conditions de préparation connues de l'homme du métier peuvent être utilisées. De manière non limitative, on peut citer les méthodes de purification suivantes permettant
20 l'obtention d'une solution de facteur VIII pré-purifiée utilisable pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention :

. Chromatographie d'échange d'ions selon par exemple l'une des variantes décrites dans les brevets EP-B-359 593, EP 0 343 275, US 4 743 680, WO 97/17370 et EP 0 173 242.

25 . Chromatographie d'immunoaffinité par exemple selon l'une des variantes décrites dans les publications de demandes de brevet WO 97/39033, EP 0 286 323 ou dans le document Zimmerman et Fulcher, Thrombosis Res., Suppl. VII, p 58, 1987 ; Berntorp et Nilson, Thrombosis Res., Suppl. VII, p 60, 1987.

30 . Chromatographie de filtration sur gel en milieu dissociant ou non telle que décrite par P.J. Fay (P.J. Fay et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 79 p 7200-7204, 1982).

. Chromatographie d'affinité sur héparine immobilisée telle que décrite dans la publication de demande de brevet WO 93/22337.

Typiquement, la purification par chromatographie d'échange d'ions à partir d'une fraction plasmatique telle que la fraction cryoprécipitée du plasma, comporte une étape d'inactivation virale permettant l'inactivation des virus enveloppés. On peut utiliser différents systèmes chromatographiques, les conditions d'adsorption puis d'élution de la fraction concentrée en facteur VIII pouvant ensuite avoir une influence sur les rendements ultérieurs du procédé. On peut faire varier la nature de la matrice et de l'échangeur d'ions. On peut ainsi mettre en oeuvre un système chromatographique d'échange d'ions faibles, tel que par exemple le gel Toso Haas Toyopearl-DEAE 650 M, ou encore un système chromatographique d'échange d'ions forts, tel que par exemple le gel Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech). Lorsque la solution de départ est préparée par purification par échange d'ions, elle contient une quantité significative de facteur VIII associé à du vWF de haut poids moléculaire et l'étape a) est indispensable.

La dissociation de l'étape a) peut être effectuée en même temps que l'élution ou, suivant un autre aspect, postérieurement à l'élution. Une élution effectuée en présence d'un sel chaotrope a pour effet d'augmenter le rendement d'élution par rapport à une élution effectuée en présence d'un sel tel que NaCl, tout en assurant la dissociation, indispensable pour réaliser l'étape de filtration ultérieure dans les conditions requises.

Selon un mode de réalisation préféré, la solution concentrée de facteur VIII obtenue à l'issue de la purification par chromatographie d'échange d'ions est donc éluee dans les conditions dissociantes de l'étape a), c'est-à-dire en présence d'un ion chaotrope.

La purification préalable de la solution de facteur VIII de départ peut également être obtenue par une technique de précipitation à l'héparine. Dans ce cas, on adsorbe par exemple, une fraction cryoprécipitée du plasma sur un gel d'hydroxyde d'aluminium, en présence d'héparine, avec un refroidissement à 5 une température d'environ 14°C à environ 19°C et centrifugation. Une première étape d'inactivation virale, mise en oeuvre sur le surnageant de précipitation, peut être effectuée avantageusement par un traitement solvant-détergent tel que décrit dans la 10 publication européenne de brevet EP-A-0343275. Le surnageant de précipitation est alors ajusté en pH et osmolalité avant l'étape de chromatographie par échange d'ions.

Selon un autre mode de réalisation, la solution de facteur VIII de départ est obtenue par immunoaffinité. Dans ce 15 cas, la solution de départ peut être essentiellement dépourvue de facteur VIII associé à du vWF de haut poids moléculaire. La mise en oeuvre de l'étape a) permettant la dissociation du complexe facteur VIII-vWF de haut poids moléculaire est alors optionnelle.

20 Enfin, on peut également envisager de partir d'une solution de facteur VIII recombinant, qui peut nécessiter une étape supplémentaire d'inactivation virale. Il ne sera pas nécessaire de mettre en oeuvre l'étape a).

De préférence, la solution de facteur VIII de départ aura 25 une activité spécifique au moins égale à 50 UI/mg, de préférence au moins égale à 100 UI/mg, la filtrabilité de la solution augmentant avec l'activité spécifique du facteur VIII.

L'activité spécifique telle qu'indiquée s'entend avant ajout éventuel d'albumine en vue de la stabilisation du 30 facteur VIII.

Plus particulièrement, on utilisera une solution de départ dans laquelle la concentration en facteur VIII : C est de environ 2 à environ 100 U/ml de préférence de environ 10 à environ 50 U/ml.

La teneur en protéines de la solution de facteur VIII de départ sera avantageusement de environ 0.05 à environ 0.5 mg/ml, de préférence de environ 0.1 à environ 0.5 mg/ml.

La teneur en protéines est déterminée par la technique de dosage des protéines de Bradford (trousse de dosage commercialisée par la société Pierce).

Une fois la filtration effectuée, les facteurs VIII et von Willebrand qui ont été filtrés, sont réassociés sous forme de complexes, après élimination des agents dissociants, par exemple par dialyse, et on récupère, éventuellement après une étape de lyophilisation, la solution de facteur VIII formulée pour une utilisation commerciale.

L'invention a également pour objet une solution de facteur VIII sécurisée viralement et essentiellement dépourvue de vWF de haut poids moléculaire susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention.

Enfin, l'invention concerne les solutions obtenues selon l'invention à titre de médicament, plus particulièrement pour traiter l'hémophilie A.

L'invention sera décrite plus en détails à l'aide des exemples qui suivent, qui illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée. Les exemples sont accompagnés de la Figure 1 qui représente :

. Figure 1 : courbe qui met en évidence la variation de la filtrabilité du facteur VIII sur membrane Planova® 15 N en fonction de la pression appliquée au système. En abscisse, figure la pression exprimée en bars et en ordonnées, figure le rendement de filtration exprimé en pourcentage (rapport entre l'activité FVIIIIC exprimée en UI/ml du filtrat sur celle du produit de départ).

EXEMPLE 1 : Préparation d'une solution de facteur VIII par filtration à partir d'une fraction cryoprécipitée du plasma.

La préparation de la solution de facteur VIII de départ est effectuée conformément à l'enseignement du brevet FR 2 632 309 dont le contenu est ici incorporé par référence.

835 g de cryoprécipité représentant 113,5 litres de plasma sont ressolubilisés par agitation dans une solution d'eau héparinée (3UI/ml) à la température ambiante pendant 30 minutes. 4217 ml de solution riche en facteur VIII et en protéines sont clarifiés par adsorption sur 90 g de gel d'hydroxyde d'aluminium et par précipitation acide (pH 6,50) et abaissement de la température entre 15 et 19°C. Un précipité enrichi en fibrinogène et fibronectine est séparé par centrifugation, ce qui permet d'obtenir une solution limpide de facteur VIII de pureté intermédiaire qui est inactivée des virus enveloppés par addition de Polysorbate 80 et de Tri-n-butyl Phosphate (respectivement en solution q.s.p 1% et 0,3%) pendant au moins 6 heures à pH 7,1.

5172 ml de solution de facteur VIII viro-inactivée vis à vis des virus enveloppés sont adsorbés à 560 ml de gel de chromatographie d'échange d'anions faibles (TosoHaas Toyopearl-DEAE 650M) préalablement équilibré en solution saline tamponnée. Après 2 heures d'adsorption, le gel est lavé par une solution saline d'osmolalité 390 mOsm/Kg et tamponnée à pH 7,00. La fraction non adsorbée sur le gel est riche en fibrinogène. Le gel est ensuite élué d'une fraction enrichie en facteur von Willebrand par augmentation de l'osmolalité à 452 mOsm/Kg. La fraction concentrée de très haute pureté en facteur VIII est ensuite éluee par modification du pH à 6,0 et augmentation de la force ionique. La fraction éluee est ensuite ajustée en CaCl_2 à une concentration de 0.35M et une osmolalité de 1300 ± 100 mOsm/Kg. Cette fraction est constituée d'un mélange de facteur VIII et de facteur von Willebrand sous forme dissociée grâce à l'action de la forte teneur en calcium.

1260 ml de solution stable à +4°C sont réchauffés extemporanément à +35°C pour subir une étape d'élimination de virus par filtration à l'aide d'un filtre BMM Planova® 15N au seuil de porosité 15 nanomètres et ayant une surface de 0,12 m².

5 Le débit est maintenu au cours de la filtration de telle manière à ce que la pression transmembranaire soit toujours inférieure à 0,2 bar. Après filtration du facteur VIII, 210 ml de solution saline tamponnée d'osmolalité 1300 mOsm/Kg sont ensuite filtrés sur la membrane afin de récupérer 1470 ml de solution de

10 facteur VIII exempte de virus pathogènes. La solution tampon permet d'équilibrer les filtres en osmolalité et pH et sert à rincer les filtres après filtration du facteur VIII. La solution de facteur VIII obtenue est appauvrie en facteur von Willebrand de très haut degré de polymérisation (\geq à 15) mais contient

15 suffisamment de facteur von Willebrand de degré de polymérisation \geq à 5 et \geq à 10 pour recomplexer le facteur VIII après dialyse.

Résultats :

Le Tableau 1 indique aux différentes étapes du procédé

20 selon l'invention les quantités de facteur VIII obtenues ainsi que l'activité spécifique (AS), la teneur en protéines et le rendement de l'étape en cause.

TABLEAU 1

	Volume (ml)	FVIII:C (UI/ml)	Protéines mg/ml	FVIII total (UI)	AS (UI/mg)	Rendement (%)
Solution éluee de chromatographie	1260	22	0,32	27720	69	100
Solution de facteur VIII filtrée à 15 nm	1470	12	0,14	17640	86	64
Solution dialysée et concentrée	149	108	1,13	16092	95	58,1

5 EXEMPLE 2 : Les conditions sont identiques à celles de
 l'exemple 1 sauf que 10 000g de cryoprécipité représentant 1 330
 litres de plasma sont mis en oeuvre. 13 700 ml de solution de
 facteur VIII viro-inactivée vis à vis des virus enveloppés sont
 filtrés. Après filtration du facteur VIII, 2 litres de solution
 tampon, d'osmolalité 1300 mOsm/Kg sont filtrés afin de récupérer
 10 15 700 ml de solution de facteur VIII exempte de virus
 pathogènes. La membrane de filtration utilisée est une membrane
 BMM Planova® 15N d'une surface de 1,0 m².

Le Tableau 2 reproduit ci-après, indique pour une
 filtration d'un équivalent 1330 litres de plasma, sur membrane
 15 BMM Planova® 15N d'une surface de 1,0 m², les quantités de
 facteur VIII obtenues aux différentes étapes du procédé de
 filtration ainsi que l'activité spécifique et le rendement de
 l'étape en cause.

TABLEAU 2

	Volume (ml)	FVIII:C (UI/ml)	Protéines mg/ml	FVIII total (UI)	AS (UI/mg)	Rendement (%)
Solution éluée de chromatographie	13700	15,0	0,09	205500	167	100
Solution de facteur VIII filtrée à 15 nm	15700	7,9	0,045	124030	176	60,3
Solution dialysée et concentrée	956	119	0,72	113764	165	55,5

EXEMPLE 3 : Préparation d'une solution de facteur VIII par
5 filtration à partir d'une fraction issue d'un cryoprécipité du
plasma et pré-purifiée par précipitation à l'héparine.

La préparation de la solution de facteur VIII de départ est
effectuée conformément à l'enseignement du brevet US 4 743 680
dont le contenu est incorporé par référence.

10 678g de cryoprécipité représentant 92,2 litres de plasma
sont ressolubilisés par agitation dans une solution d'eau
héparinée (3UI/ml) à la température ambiante pendant 30 minutes.
3424 ml de solution riche en facteur VIII et en protéines sont
clarifiés comme dans l'Exemple 1.

15 4200 ml de solution de facteur VIII viro-inactivée vis à
vis des virus enveloppés dans les mêmes conditions que l'Exemple
1, sont adsorbés après acidification à pH 6,50 à 300 ml de gel
de chromatographie d'échange d'anions forts (Pharmacia Biotech
Q-Sepharose Fast Flow) préalablement équilibré en solution
20 saline tamponnée. Après 2 heures 30 minutes d'adsorption, le gel
est lavé par une solution saline d'osmolalité 450 mOsm/Kg et
tamponnée à pH 6,50. La fraction non adsorbée sur le gel est
riche en fibrinogène. Le gel est ensuite élué d'une fraction

enrichie en facteur von Willebrand par augmentation de l'osmolalité à 581 mOsm/Kg. La fraction concentrée de très haute pureté en facteur VIII est ensuite éluee par modification du pH à 6,0 et augmentation de la force ionique. La fraction éluee est
5 ajustée en CaCl_2 à une concentration de 0.35M et une osmolalité de 1300 ± 100 mOsm/Kg. Cette fraction est constituée d'un mélange de facteur VIII et de facteur von Willebrand sous forme dissociée grâce à l'action de la forte teneur en calcium.

1280 ml de solution stable à $+4^\circ\text{C}$ sont réchauffés
10 extemporanément à $+35^\circ\text{C}$ pour subir une étape d'élimination de virus par filtration de la même façon que dans l'Exemple 1 sur une membrane Planova 15N au seuil de porosité 15 nanomètres et ayant une surface de $0,12 \text{ m}^2$. Un volume de 180 ml de solution tampon d'osmolalité 1300 mOsm/Kg est ensuite filtré afin de
15 récupérer 1460 ml de solution de facteur VIII exempte de virus pathogènes. Cette solution de facteur VIII est appauvrie en facteur von Willebrand de très haut degré de polymérisation (≥ 15) mais contient suffisamment de facteur von Willebrand de degré de polymérisation ≥ 5 et ≥ 10 pour recomplexer le
20 facteur VIII après dialyse.

Résultats :

Le Tableau 3 reproduit ci-après, indique aux différentes étapes du procédé de filtration, les quantités de facteur VIII obtenues, la quantité totale de protéines ainsi que l'activité
25 spécifique (AS) et le rendement de l'étape en cause.

TABLEAU 3

	Volume (ml)	FVIII:C (UI/ml)	FVIII total (UI)	Protéines mg/ml	AS (UI/mg)	Rendement (%)
Solution éluée de chromatographie	1280	19	24320	0,20	95	100
Solution de facteur VIII filtrée à 15 nm	1460	13	18980	0,12	108	78
Solution dialysée et concentrée	164	92	15088	0,95	97	62

Exemple 4 : Variation de la filtrabilité d'une solution de
 5 facteur VIII sur une membrane Planova® 15 N en fonction de la
 nature et de la concentration des sels utilisés pour la
 dissociation.

Résultats :

10 Le Tableau 4 reproduit ci-après, met en évidence les
 variations du rendement de filtration en fonction de ces
 différents paramètres, les autres conditions opératoires du
 procédé demeurant celles définies à l'exemple 1.

TABLEAU 4

Agent dissociant (M)	Rendement de Filtration (%)
CaCl ₂ 0,35 M	45
NaCl 0,35 M	10
NaCl 1,0 M	26

L'utilisation d'agents dissociants permet d'augmenter de façon significative la filtrabilité du facteur VIII. L'élimination de ces agents par dialyse après filtration induit une réassociation des complexes facteur VIII - facteur von Willebrand. L'analyse des produits obtenus met en évidence une bonne capacité du facteur von Willebrand à fixer le facteur VIII.

Exemple 5 : Variation de la filtrabilité d'une solution de facteur VIII sur une membrane Planova® 15 N en fonction des paramètres de température et pression.

Le Tableau 5 reproduit ci-après, indique, le sel utilisé pour la dissociation et sa concentration demeurant inchangés, le rendement de filtration obtenu en faisant varier la pression et la température. Lorsque la température est abaissée, pour une pression donnée, on observe une diminution significative du rendement de filtration.

La Figure 1 met en outre clairement en évidence que l'abaissement de la pression transmembranaire à des valeurs très faibles permet une amélioration considérable du rendement.

TABLEAU 5

Agent dissociant	Pression (bar)	Température (°C)	Rendement de filtration (%)
CaCl ₂ 0,35M	≤ 0,10	35 ± 2	70
CaCl ₂ 0,35M	≤ 0,20	35 ± 2	58
CaCl ₂ 0,35M	0,50	35 ± 2	45
CaCl ₂ 0,35M	≤ 0,20	20 ± 2	42

Exemple 6 : Etude de la capacité de rétention virale du système de filtration dans les conditions de filtration de l'exemple 1.

On utilise comme modèle viral le phage ø x 174 dont la taille peut être évaluée à 25-30 nm. La membrane et les conditions opératoires sont celles décrites aux Exemples 1 et 2.

Résultats :

Les résultats contenus dans le Tableau 6 ci-après mettent en évidence une capacité de rétention virale tout à fait satisfaisante.

TABLEAU 6

	Surface de filtration (m ²)	FVIII:C (UI/ml)	Volume filtré (l/m ²)	Charge Virale (log)	Rétention Virale (log)
Exemple 1	0,01	15	14	8,3	>6,8
Exemple 2	0,01	19	15	7,5	>7,0

EXEMPLE 7 : Effet du procédé selon l'invention sur la teneur en vWF dans la solution de facteur VIII.

On a comparé la teneur en vWF ainsi que le profil des multimères de vWF sur une solution de facteur VIII telle que décrite à l'exemple 1, avant et après la mise en oeuvre du procédé selon l'invention.

Les résultats obtenus sont reportés au Tableau 7 ci-après.

10

TABLEAU 7

	Avant filtration	Après filtration
FVIII (UI/ml)	17	7,9
vWF (UI/ml)	5,6	0,39
vWF / FVIII	0,33	0,05
multimères de vWF ≥ 15	12 %	-
multimères de vWF ≥ 10	32,4 %	3,3 %
multimères de vWF ≥ 5	71,5 %	35,6 %

Ainsi, la mise en oeuvre du procédé selon l'invention permet bien d'obtenir une solution de facteur VIII essentiellement dépourvue de vWF à haut poids moléculaire, notamment essentiellement dépourvue des formules multimériques avec un degré de polymérisation ≥ 15 .

15

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation par filtration d'une solution de facteur VIII sécurisée viralement et essentiellement dépourvue
5 de vWF de haut poids moléculaire, selon lequel :

- on prépare une solution contenant du facteur VIII de haute ou très haute pureté contenant ou essentiellement dépourvue de complexes de haut poids moléculaire facteur VIII-vWF ;

10 - on met en oeuvre de façon optionnelle, une étape a) permettant, si nécessaire, la dissociation des complexes de haut poids moléculaire facteur VIII-vWF et l'obtention d'une solution essentiellement dépourvue de facteur VIII associé à du vWF de haut poids moléculaire ;

15 - on met en oeuvre une étape b) de filtration de ladite solution essentiellement dépourvue de facteur VIII associé à du vWF de haut poids moléculaire sur un filtre hydrophile ayant une porosité aussi faible que 15nm.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que
20 ladite étape de dissociation est réalisée au moyen d'un ion chaotropique en quantité suffisante pour permettre la dissociation.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit ion chaotropique est un ion divalent.

25 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit ion divalent est l'ion Ca^{2+} .

5. Procédé selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que ledit ion divalent est ajouté sous forme d'une solution saline de 0.2 M à saturation des sels.

30 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite solution est une solution de CaCl_2 .

7. Procédé selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que ledit ion Ca^{2+} est ajouté sous forme d'une solution CaCl_2 , 0.35 M à saturation.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'étape b) est effectuée à une pression inférieure au seuil des recommandations préconisées par le fournisseur.

5 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit filtre est une membrane Planova® 15 N utilisé à une pression inférieure à 0,3 bar, de préférence inférieure à 0,2 bar.

10 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'étape b) est effectuée à une température de l'ordre de $35 \pm 5^\circ\text{C}$.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la solution de départ est obtenue par purification d'une fraction plasmatique, notamment la fraction
15 cryoprécipitée du plasma, par chromatographie d'échange d'ions.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la fraction concentrée de facteur VIII obtenue à l'issue de la purification par chromatographie d'échange d'ions est éluee dans les conditions dissociantes de l'étape a).

20 13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la solution de facteur VIII de départ est obtenue par pré-purification d'une fraction plasmatique, notamment la fraction cryoprécipitée du plasma, par précipitation à l'héparine.

25 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la solution de facteur VIII de départ est partiellement inactivée viralement par traitement solvant-détergent.

30 15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la solution de facteur VIII de départ comprend du facteur VIII immunopurifié.

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la solution de facteur VIII de départ comprend du facteur VIII recombinant.

17. Procédé selon l'une des revendication 1 à 16, caractérisé en ce que le facteur VIII dans la solution de départ a une activité spécifique au moins égale à 50 UI/mg, de préférence au moins égale à 100 UI/mg.

5 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que la concentration en facteur VIII C de la solution de facteur VIII de départ est de environ 2 à environ 100 U/ml, de préférence de environ 10 à environ 50 U/ml.

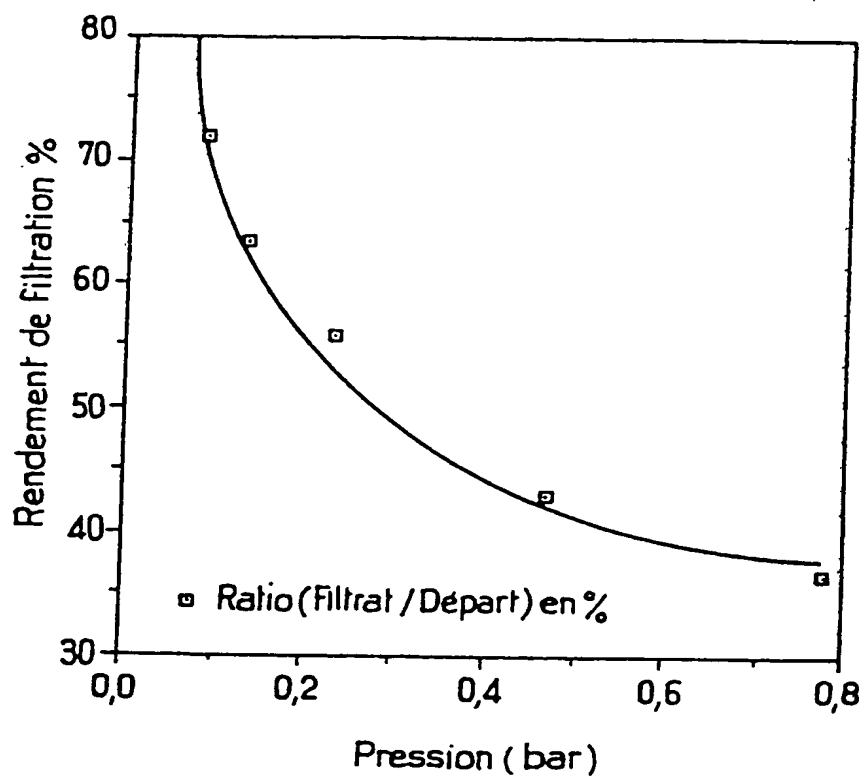
10 19. Procédé selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que la teneur en protéines de la solution de facteur VIII de départ est de environ 0.05 à environ 0.5 mg/ml, de préférence de environ 0.1 à environ 0.5 mg/ml.

15 20. Solution de facteur VIII sécurisée viralement susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.

21. Solution selon la revendication 20, à titre de médicament.

22. Solution selon la revendication 20, à titre de médicament pour le traitement de l'hémophilie A.

1 / 1

FIG.1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nal Application No

PCT/FR 98/02715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/755 A61K38/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 00237 A (PHARMACIA AB ;WINGE STEFAN (SE)) 4 January 1996 see page 5, line 21 - line 24 see page 7, line 30 - page 8, line 20; claims	1,9
A	WO 91 18017 A (FOND NAT TRANSFUSION SANGUINE) 28 November 1991 see page 4, line 11 - line 15; claims 1,5	1-7, 20-22
A	EP 0 197 554 A (ARMOUR PHARMA) 15 October 1986 see page 3, line 16 - line 20 see page 6, line 4 - line 20; claims; example 6	1,20-22
	--- -/-	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 May 1999

Date of mailing of the international search report

12/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter: nal Application No
PCT/FR 98/02715

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 383 645 A (ASSOCIATION D'AQUITAINE POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA TRANSFUSION SANGUI) 22 August 1990 see page 6, line 22 - line 27; claims; example -----	1,20-22
A	EP 0 468 181 A (SCLAVO SPA) 29 January 1992 see page 4, line 23 - line 29; claims -----	1,20-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...information on patent family members

Inter- national Application No

PCT/FR 98/02715

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9600237 A	04-01-1996	SE 502820 C AU 682274 B AU 2813295 A DE 796269 T EP 0796269 A ES 2105992 T FI 965145 A GR 97300038 T JP 10502074 T NO 965523 A NZ 288789 A SE 9402254 A	22-01-1996 25-09-1997 19-01-1996 02-01-1998 24-09-1997 01-11-1997 20-12-1996 28-11-1997 24-02-1998 20-12-1996 19-12-1997 24-12-1995
WO 9118017 A	28-11-1991	FR 2662166 A	22-11-1991
EP 0197554 A	15-10-1986	US 4673733 A AT 54828 T AU 5596086 A CA 1262682 A DK 161786 A JP 1863690 C JP 61275210 A	16-06-1987 15-08-1990 06-11-1986 07-11-1989 12-10-1986 08-08-1994 05-12-1986
EP 383645 A	22-08-1990	FR 2644064 A AT 88188 T DK 383645 T ES 2055875 T JP 2282400 A JP 2521551 B US 5760183 A	14-09-1990 15-04-1993 02-08-1993 01-09-1994 19-11-1990 07-08-1996 02-06-1998
EP 0468181 A	29-01-1992	IT 1248723 B CA 2044191 A JP 4243899 A US 5259951 A	26-01-1995 13-12-1991 31-08-1992 09-11-1993

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Deme Internationale No

PCT/FR 98/02715

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07K14/755 A61K38/37

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 00237 A (PHARMACIA AB ;WINGE STEFAN (SE)) 4 janvier 1996 voir page 5, ligne 21 - ligne 24 voir page 7, ligne 30 - page 8, ligne 20; revendications	1,9
A	WO 91 18017 A (FOND NAT TRANSFUSION SANGUINE) 28 novembre 1991 voir page 4, ligne 11 - ligne 15; revendications 1,5	1-7, 20-22
A	EP 0 197 554 A (ARMOUR PHARMA) 15 octobre 1986 voir page 3, ligne 16 - ligne 20 voir page 6, ligne 4 - ligne 20; revendications; exemple 6	1,20-22

-/--



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 mai 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/05/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema 'internationale No

PCT/FR 98/02715

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 383 645 A (ASSOCIATION D'AQUITAINE POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA TRANSFUSION SANGUI) 22 août 1990 voir page 6, ligne 22 - ligne 27; revendications; exemple -----	1,20-22
A	EP 0 468 181 A (SCLAVO SPA) 29 janvier 1992 voir page 4, ligne 23 - ligne 29; revendications -----	1,20-22

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demi Internationale No

PCT/FR 98/02715

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9600237 A	04-01-1996	SE 502820 C	22-01-1996
		AU 682274 B	25-09-1997
		AU 2813295 A	19-01-1996
		DE 796269 T	02-01-1998
		EP 0796269 A	24-09-1997
		ES 2105992 T	01-11-1997
		FI 965145 A	20-12-1996
		GR 97300038 T	28-11-1997
		JP 10502074 T	24-02-1998
		NO 965523 A	20-12-1996
		NZ 288789 A	19-12-1997
		SE 9402254 A	24-12-1995
WO 9118017 A	28-11-1991	FR 2662166 A	22-11-1991
EP 0197554 A	15-10-1986	US 4673733 A	16-06-1987
		AT 54828 T	15-08-1990
		AU 5596086 A	06-11-1986
		CA 1262682 A	07-11-1989
		DK 161786 A	12-10-1986
		JP 1863690 C	08-08-1994
		JP 61275210 A	05-12-1986
EP 383645 A	22-08-1990	FR 2644064 A	14-09-1990
		AT 88188 T	15-04-1993
		DK 383645 T	02-08-1993
		ES 2055875 T	01-09-1994
		JP 2282400 A	19-11-1990
		JP 2521551 B	07-08-1996
		US 5760183 A	02-06-1998
EP 0468181 A	29-01-1992	IT 1248723 B	26-01-1995
		CA 2044191 A	13-12-1991
		JP 4243899 A	31-08-1992
		US 5259951 A	09-11-1993